

PCTWELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales BüroINTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation ⁶ : C12N 9/00	A2	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 99/58647 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 18. November 1999 (18.11.99)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP99/03071 (22) Internationales Anmeldedatum: 5. Mai 1999 (05.05.99) (30) Prioritätsdaten: 198 22 122.3 8. Mai 1998 (08.05.98) DE (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): AVENTIS RESEARCH & TECHNOLOGIES GMBH & CO. KG [DE/DE]; D-65926 Frankfurt am Main (DE). (72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): HÜLS, Christoph [DE/DE]; Rheinblick 19, D-55263 Wackernheim (DE). GALLERT, Karl-Christiah [DE/DE]; Rendeler Strasse 91, D-61184 Karben (DE). KÖRNER, Christof [DE/DE]; Karolinen Strasse 3, D-80538 München (DE). WAHLE, Elmar [DE/DE]; An der Fels 20, D-35435 Wattenberg (DE).		(81) Bestimmungsstaaten: AU, CA, CZ, HU, JP, KR, NZ, PL, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). Veröffentlicht <i>Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.</i>
(54) Title: HUMAN DEADENYLATING NUCLEASE, ITS PRODUCTION AND ITS USE (54) Bezeichnung: HUMANE DEADENYLIERENDE NUCLEASE, IHRE HERSTELLUNG UND VERWENDUNG (57) Abstract The invention relates to a nucleic acid coding for a human deadenylating nuclease (DAN) which has an amino acid sequence in accordance with SEQ 11 or one of its functional variants, and to parts thereof having at least 8 nucleotides. (57) Zusammenfassung Die Erfindung betrifft eine Nukleinsäure kodierend für eine humane deadenylierende Nuclease (DAN) mit einer Aminosäuresequenz gemäß SEQ 11 oder eine funktionelle Variante davon, und Teile davon mit mindestens 8 Nukleotiden.		

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidshon	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauretanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

Humane deadenylierende Nuclease, ihre Herstellung und Verwendung

Beschreibung

5

Die vorliegende Erfindung bezieht sich auf eine humane deadenylierende Nuclease (DAN), ihre kodierende Nukleinsäure sowie ihre Herstellung und Verwendung.

10

15

20

Die intrazelluläre Konzentration von mRNA scheint nicht nur durch die Produktions- sondern auch durch die Abbaurrate kontrolliert zu sein. Dabei scheinen mRNAs nicht durch ein zufälliges nukleolytisches Ereignis, sondern durch spezifische Mechanismen und durch Abbauraten, die spezifisch für die jeweilige RNA sind, abgebaut zu werden. Zur Zeit sind zwei unterschiedliche Abbauewege bekannt, in denen die poly(A)-Schwänze eine besondere Rolle spielen. In *E. coli* werden poly(A)-Schwänze an mRNAs oder mRNA-Fragmente angehängt, die durch die RNase E generiert werden. Der poly(A)-Schwanz scheint als eine relativ unstrukturierte Einheit zu fungieren, die für die Anlagerung eines Komplexes verantwortlich ist, der neben anderen Proteinen eine prozessive 3'-Exonuclease, die eine Polynucleotid-Phosphorylase darstellt, und eine RNA-abhängige ATPase enthält, welche der Exonuclease hilft, inhibierende Sekundärstrukturen in der mRNA zu umgehen. Ein ähnlicher Mechanismus scheint in Chloroplasten zu wirken.

25

30

In Eukaryonten leitet die exonukleolytische Verkürzung des poly(A)-Schwanzes ebenfalls den Abbau von vielen, aber nicht allen mRNAs ein. In Gegensatz zu dem Prozeß in Bakterien scheint die poly(A)-abbauende Exonuclease nicht in die 3'-UTR und die kodierende Sequenz in ihrem Abbau fortzuschreiten. Statt dessen scheint die eukaryotische Exonuclease nach Abbau des poly(A)-Schwanzes anzuhalten. Bei *S. cerevisiae* beinhaltet der zweite Schritt des mRNA-Abbaus die Entfernung der 5'-Cap-Struktur durch eine spezifische Pyrophosphatase. Allerdings findet die Entfernung des CAPs erst nach der einer Verkürzung des poly(A)-Schwanzes auf ca. 10-

15 Nukleotide statt. Die Entfernung der CAP-Struktur macht die mRNA für 5'-Exonucleasen, deren wichtigster Vertreter durch das XRN1-Gen codiert wird, zugänglich.

- 5 Die Beobachtung des initialen Deadenylierungsprozesses in Säugetierzellen ist relativ einfach, während eine Untersuchung der weiteren Schritte durch die Schnelligkeit der nachfolgenden Abbauprozesse und das Fehlen von analysierbaren Zwischenprodukten erschwert wird. Indirekte Beweise sprechen aber dennoch für eine Entfernung der CAP-Struktur im zweiten Schritt. Ein Homolog aus der Maus ist für
- 10 das XRN1-Gen beschrieben worden. Im allgemeinen werden stabile mRNAs langsam und instabile mRNAs schnell deadenyliert. Der schnelle Abbau hängt von dem Vorkommen von bestimmten destabilisierenden Sequenzen in dem 3'-UTR oder in der codierenden Sequenz ab. Mutationen in diesen Sequenzen führen zudem nicht nur zu einer Stabilisierung der mRNA, sondern ebenfalls zu einer verlangsamten
- 15 Deadenylierung. Im Gegensatz dazu führt eine Inaktivierung eines stabilisierenden Elements der α -Globulin mRNA zu einer Instabilität und zu einer beschleunigten Deadenylierung. Diese Daten sprechen eindeutig für eine Kontrolle des mRNA-Abbaus durch die Deadenylierungsrate.
- 20 Die Deadenylierung von bestimmten mRNAs kann ebenfalls zu einer Inaktivierung der Translation führen. Dies ist durch die Bedeutung des poly(A)-Schwanzes für die Initiation der Translation zu erklären. Die Deadenylierung als Translationskontrollmechanismus spielt bei der Reifung von Oozyten und der frühen Embryogenese in vielen tierischen Spezies eine entscheidende Rolle. Zum Beispiel wird bei Drosophila die Polarität des Embryos durch die Deadenylierung der sogenannten
- 25 hunchback mRNA reguliert.

In Vertebraten können grundsätzlich drei Deadenylierungsreaktionen in der Oozytenreifung und frühen Embryogenese unterschieden werden:

- 30 1. In unreifen Oozyten werden die meisten mRNAs in einer translational inaktiven Form mit kurzen poly(A)-Schwänzen gespeichert. Ein Beispiel ist die mRNA für

tPA (tissue plasminogen activator) in der Maus. Zunächst erhält diese mRNA einen langen poly(A)-Schwanz in der normalen Polyadenylierungsreaktion, der dann durch Deadenylierung in einen Oligo(A)-Schwanz verkürzt wird. Diese Verkürzung wird durch Sequenzen im 3'-UTR gesteuert.

- 5 2. Bei der Reifung von Oozyten wird die Deadenylierung zur Inaktivierung bestimmter mRNAs verwendet, die ursprünglich lange poly(A)-Schwänze hatten und in der frühen Eientwicklung aktiv waren. Die Deadenylierung ist nicht von spezifischen Sequenzen in der mRNA abhängig. Alle mRNAs werden deadenyliert, außer sie werden durch einen aktiven Adenylierungsprozess geschützt.
- 10 3. Während der frühen Embryogenese werden bestimmte mRNAs in einer spezifischen Reaktion deadenyliert, die ebenfalls spezifische Sequenzen im 3'-UTR benötigt.

Alle drei Deadenylierungsreaktionen finden im Cytoplasma statt. Allerdings bleiben
15 in Gegensatz zu somatischen Zellen die oligoadenylierten oder deadenylierten mRNAs in Oozyten stabil und werden erneut adenyliert oder erst in späteren Entwicklungsstadien abgebaut.

Bisher sind die für diese Reaktionen verantwortlichen Enzyme nicht eindeutig identifiziert worden. In der Hefe konnte gezeigt werden, daß der Abbau von poly(A) direkt oder indirekt vom poly(A) binding protein (PAB1) abhängt. Obwohl eine PAB1-abhängige Poly(A)nuclease (PAN) gereinigt worden ist (Sachs, A.B. & Deardorff (1992) Cell, 70, 961; Lowell, J.E. et al. (1992) Genes Dev., 6, 2088), konnten bei Mutanten der betreffenden Gene (PAN2 und PAN3) nur geringe Defekte in der
20 Deadenylierung festgestellt werden (Boeck, R. et al. (1996) 271 (1), 432; Brown, C. et al. (1996) 16 (10) 5744).

Körner, Ch.G. & Wahle, E. (1997) J. Biol. Chem., 272, 10448, No. 16 beschreiben eine Mg^{2+} -abhängige poly(A)-spezifische 3'-Exoribonuclease aus Kalbsthymus mit
30 einem Molekulargewicht von 74 kDa, die auch als deadenylierende Nuclease (DAN) bezeichnet wurde. Die beschriebene DAN aus Kalbsthymus wird durch das cytoplasmatische poly(A)-bindende Protein I (PAB I) unter bestimmten Reaktions-

bedingungen stimuliert (Körner, Chr. & Wahle, E. (1997), supra) und bevorzugt als Substrat Poly(A).

Aufgabe der vorliegenden Erfindung war es, eine humane Poly(A)-spezifische 3'-
5 Exoribonuclease bereitzustellen.

In einer Genbank wurde nun überraschenderweise ein nicht näher charakterisierter und nur ansequenzierter Klon gefunden, der gemäß der vorliegenden Erfindung für eine humane deadenylierende Nuclease (humane DAN) kodiert.

10 Ein Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist daher eine Nukleinsäure kodierend für eine humane DAN mit einer Aminosäuresequenz gemäß SEQ 11 oder eine funktionelle Variante davon, und Teile davon mit mindestens 8 Nukleotiden, vorzugsweise mit mindestens 15 oder 20 Nukleotiden, insbesondere mit mindestens 100 Nukleotiden, vor allem mit mindestens 300 Nukleotiden (nachfolgend „erfindungsgemäße Nukleinsäure“ genannt).
15

Die vollständige Nukleinsäure kodiert für ein Protein mit 639 Aminosäuren und einer molekularen Masse von 73,5 kDa. Die Expression der Nukleinsäure in E. coli führte
20 zu einem Protein, welches ähnliche enzymatische Aktivitäten wie die von Körner, Ch.G. & Wahle, E. (1997, supra) beschriebene DAN zeigt. Weitere Experimente gemäß der vorliegenden Erfindung bestätigten, daß es sich bei der Nukleinsäure um eine Nukleinsäure handelt, die für eine humane DAN kodiert. Die erfindungsgemäße Nukleinsäure wurde am 25. März 1998 bei der DSMZ-Deutsche Sammlung
25 von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Mascheroder Weg 1b, 38124 Braunschweig unter der Nummer DSM 12075 hinterlegt.

In einer bevorzugten Ausführungsform ist die erfindungsgemäße Nukleinsäure eine DNA oder RNA, vorzugsweise eine doppelsträngige DNA, und insbesondere eine
30 DNA mit einer Nukleinsäuresequenz gemäß SEQ 12 von Pos. 58 bis Pos. 1977. Die beiden Positionen bestimmen gemäß der vorliegenden Erfindung den Start und das Ende des kodierenden Bereiches.

Unter dem Begriff „funktionelle Variante“ versteht man gemäß der vorliegenden Erfindung eine Nukleinsäure, die funktionell mit der humanen DAN-kodierenden Nukleinsäure verwandt und insbesondere humanen Ursprungs ist. Beispiele verwandter Nukleinsäuren sind beispielsweise Nukleinsäuren aus unterschiedlichen humanen Zellen bzw. Geweben oder allelische Varianten. Die vorliegende Erfindung umfaßt ebenfalls Varianten von Nukleinsäuren, die von verschiedenen menschlichen Individuen stammen können.

Im weiteren Sinne versteht man unter dem Begriff „Varianten“ gemäß der vorliegenden Erfindung Nukleinsäuren, die eine Homologie, insbesondere eine Sequenzidentität von ca. 60%, vorzugsweise von ca. 75%, insbesondere von ca. 90% und vor allem von ca. 95% aufweisen.

Die Teile der erfindungsgemäßen Nukleinsäure können beispielsweise zur Herstellung einzelner Epitope, als Sonden zur Identifizierung weiterer funktioneller Varianten oder als Antisense-Nukleinsäuren verwendet werden. Beispielsweise eignet sich eine Nukleinsäure aus mindestens ca. 8 Nukleotiden als Antisense-Nukleinsäure, eine Nukleinsäure aus mindestens ca. 15 Nukleotiden als Primer beim PCR-Verfahren, eine Nukleinsäure aus mindestens ca. 20 Nukleotiden für die Identifizierung weiterer Varianten und eine Nukleinsäure aus mindestens ca. 100 Nukleotiden als Sonde.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform enthält die erfindungsgemäße Nukleinsäure eine oder mehrere nicht-kodierende Sequenzen und/oder eine Poly(A)-Sequenz. Die nicht-kodierenden Sequenzen sind beispielsweise Intronsequenzen oder regulatorische Sequenzen, wie Promotor- oder Enhancer-Sequenzen, zur kontrollierten Expression des humanen DAN kodierenden Gens.

In einer weiteren Ausführungsform ist die erfindungsgemäße Nukleinsäure daher in einem Vektor, vorzugsweise in einem Expressionsvektor oder gentherapeutisch wirksamen Vektor enthalten.

Die Expressionsvektoren können beispielsweise prokaryotische oder eukaryotische Expressionsvektoren sein. Beispiele für prokaryotische Expressionsvektoren sind für die Expression in *E. coli* z.B. der T7 Expressionsvektor pGM10 (Martin, 1996), welcher für einen N-terminalen Met-Ala-His6-Tag kodiert, der eine vorteilhafte Reinigung des exprimierten Proteins über eine Ni^{2+} -NTA-Säule ermöglicht. Als eukaryotische Expressionsvektoren für die Expression in *Saccharomyces cerevisiae* eignen sich z.B. die Vektoren p426Met25 oder p426GAL1 (Mumberg et al. (1994) Nucl. Acids Res., 22, 5767), für die Expression in Insektenzellen z.B. Baculovirus-Vektoren wie in EP-B1-0127839 oder EP-B1-0549721 offenbart, und für die Expression in Säugerzellen z.B. SV40-Vektoren, welche allgemein erhältlich sind.

Im allgemeinen enthalten die Expressionsvektoren auch für die Wirtszelle geeignete regulatorische Sequenzen, wie z.B. den *trp*-Promotor für die Expression in *E. coli* (s. z.B. EP-B1-0154133), den ADH-2-Promotor für die Expression in Hefen (Russel et al. (1983), J. Biol. Chem. 258, 2674), den Baculovirus-Polyhedrin-Promotor für die Expression in Insektenzellen (s. z.B. EP-B1-0127839) oder den frühen SV40-Promotor oder LTR-Promotoren z.B. von MMTV (Mouse Mammary Tumour Virus; Lee et al. (1981) Nature, 214, 228).

Beispiele von gentherapeutisch wirksamen Vektoren sind Virusvektoren, vorzugsweise Adenovirusvektoren, insbesondere replikationsdefiziente Adenovirusvektoren, oder Adenoassoziierte Virusvektoren, z.B. ein Adenoassoziiierter Virusvektor, der ausschließlich aus zwei insertierten terminalen Wiederholungssequenzen (ITR) besteht.

Geeignete Adenovirusvektoren sind beispielsweise in McGrory, W.J. et al. (1988) Virol. 163, 614; Gluzman, Y. et al. (1982) in „Eukaryotic Viral Vectors“ (Gluzman, Y. ed.) 187, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, New York; Chroboczek, J. et al. (1992) Virol. 186, 280; Karlsson, S. et al. (1986) EMBO J. 5, 2377 oder WO95/00655 beschrieben.

Geeignete Adeno-assoziierte Virusvektoren sind beispielsweise in Muzyczka, N. (1992) Curr. Top. Microbiol. Immunol. 158, 97; WO95/23867; Samulski, R.J. (1989) J. Virol, 63, 3822; WO95/23867; Chiorini, J.A. et al. (1995) Human Gene Therapy 6, 1531 oder Kotin, R.M. (1994) Human Gene Therapy 5, 793 beschrieben.

5

Gentherapeutisch wirksame Vektoren lassen sich auch dadurch erhalten, daß man die erfindungsgemäße Nukleinsäure mit Liposomen komplexiert. Hierzu eignen sich Lipidmischungen wie bei Felgner, P.L. et al. (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84, 7413; Behr, J.P. et al. (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, 6982; Felgner, J.H. et al. (1994) J. Biol. Chem. 269, 2550 oder Gao, X. & Huang, L. (1991) Biochim. Biophys. Acta 1189, 195 beschrieben. Bei der Herstellung der Liposomen wird die DNA ionisch auf der Oberfläche der Liposomen gebunden, und zwar in einem solchen Verhältnis, daß eine positive Nettoladung verbleibt und die DNA vollständig von den Liposomen komplexiert wird.

15

Die erfindungsgemäße Nukleinsäure kann beispielsweise chemisch anhand der in SEQ 12 offenbarten Sequenz oder anhand der in SEQ 11 offenbarten Peptidsequenz unter Heranziehen des genetischen Codes z.B. nach der Phosphotriester-Methode synthetisiert werden (s. z.B. Uhlman, E. & Peyman, A. (1990) Chemical Reviews, 90, 543, No. 4). Eine weitere Möglichkeit, die erfindungsgemäße Nukleinsäure in die Hand zu bekommen, ist die Isolierung aus einer geeigneten Genbank, beispielsweise aus einer humanen Genbank, anhand einer geeigneten Sonde (s. z.B. Sambrook, J. et al. (1989) Molecular Cloning. A laboratory manual. 2nd Edition, Cold Spring Harbor, New York). Als Sonde eignen sich beispielsweise einzelsträngige DNA-Fragmente mit einer Länge von ca. 100 bis 1000 Nucleotiden, vorzugsweise mit einer Länge von ca. 200 bis 500 Nucleotiden, insbesondere mit einer Länge von ca. 300 bis 400 Nucleotiden, deren Sequenz aus der Nukleinsäuresequenz gemäß SEQ 12 abgeleitet werden kann.

25

30

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist auch das Polypeptid selbst mit einer Aminosäuresequenz gemäß SEQ 11 oder einer funktionellen Variante davon, und Teile davon mit mindestens sechs Aminosäuren, vorzugsweise mit minde-

stens 12 Aminosäuren, insbesondere mit mindestens 65 Aminosäuren und vor allem mit 638 Aminosäuren (nachfolgend „erfindungsgemäßes Polypeptid“ genannt). Beispielsweise kann ein ca. 6-12, vorzugsweise ca. 8 Aminosäuren-langes Polypeptid ein Epitop enthalten, das nach Kopplung an einen Träger zur Herstellung von spezifischen poly- oder monoklonalen Antikörper dient (siehe hierzu z. B. US 5,656,435). Polypeptide mit einer Länge von mindestens ca. 65 Aminosäuren können auch direkt ohne Träger zur Herstellung von poly- oder monoklonalen Antikörper dienen.

Unter dem Begriff „funktionelle Variante“ im Sinne der vorliegenden Erfindung versteht man Polypeptide, die funktionell mit dem erfindungsgemäßen Peptid verwandt sind, d.h. eine Poly(A)-spezifische 3'-Exoribonucleaseaktivität aufweisen und vorzugsweise unter zwei verschiedenen Reaktionsbedingungen aktiv sind. Bei der ersten Reaktionsbedingung ist in Abwesenheit von Salz die Aktivität vollständig von der Anwesenheit von Spermidin abhängig. Im Gegensatz hierzu ist in Abwesenheit von Spermidin die Aktivität des Enzyms von der Salzkonzentration abhängig. Zudem kann in Anwesenheit von PAB1 unter bestimmten Reaktionsbedingungen ein stufenweiser Abbau des Poly(A)-Schwanzes beobachtet werden (siehe auch Körner, Chr. G. & Wahle, E. (1997), supra). Insbesondere unterscheiden sich die vorherrschenden Abbauprodukte in ihrer Länge um ca. 30 Nukleotide. Unter Varianten versteht man auch allelische Varianten oder Polypeptide, die von anderen menschlichen Zellen bzw. Gewebe abstammen. Auch versteht man darunter Polypeptide, die von verschiedenen menschlichen Individuen stammen.

Im weiteren Sinne versteht man darunter auch Polypeptide, die eine Sequenzhomologie, insbesondere eine Sequenzidentität von ca. 70%, vorzugsweise von ca. 80%, insbesondere von ca. 90%, vor allem von ca. 95% zu dem Polypeptid mit der Aminosäuresequenz gemäß SEQ 11 haben. Ferner zählen hierzu auch Deletion des Polypeptids im Bereich von ca. 1 - 60, vorzugsweise von ca. 1 - 30, insbesondere von ca. 1 - 15, vor allem von ca. 1 - 5 Aminosäuren. Beispielsweise kann die erste Aminosäure Methionin fehlen, ohne daß die Funktion des Polypeptids wesentlich verändert wird. Daneben zählen hierzu auch Fusionsproteine, die die oben be-

schriebenen erfindungsgemäßen Polypeptide enthalten, wobei die Fusionsproteine selbst bereits die Funktion einer humanen DAN haben oder erst nach Abspaltung des Fusionsanteils die spezifische Funktion bekommen können. Vor allem zählen hierzu Fusionsproteine mit einem Anteil von insbesondere nicht-humanen Sequenzen von ca. 1 - 200, vorzugsweise ca. 1 - 150, insbesondere ca. 1 - 100, vor allem ca. 1 - 50 Aminosäuren. Beispiele von nicht-humanen Peptidsequenzen sind prokaryotische Peptidsequenzen, z.B. aus der Galactosidase von E. coli oder ein sogenannter Histidin-Tag, z.B. ein Met-Ala-His₆-Tag. Ein Fusionsprotein mit einem sogenannten Histidin-Tag eignet sich besonders vorteilhaft zur Reinigung des exprimierten Proteins über Metallionen-haltige Säulen, beispielsweise über eine Ni²⁺-NTA-Säule. „NTA“ steht für den Chelator „nitrilotriacetic acid“ (Qiagen GmbH, Hilden).

Die Teile des erfindungsgemäßen Polypeptids repräsentieren beispielsweise Epitope, die spezifisch von Antikörpern erkannt werden können.

Durch Vergleich mit bekannten Nucleasen wurde gefunden, daß das erfindungsgemäße Polypeptid ein Mitglied der sogenannten RNaseD-Familie ist. Figur 4 zeigt die konservierten Aminosäuren der Exo I, Exo II und Exo III Motive, die für diese Klasse von Exonucleasen charakteristisch sind. Andere konservierte Aminosäuren sind grau unterlegt. Die drei sauren Aminosäureseitenketten, zwei in der Exo I Domäne und eine in der Exo III Domäne, sind direkt in der Bindung der zwei Mg²⁺-Ionen, die an der enzymatischen Hydrolyse beteiligt sind, involviert. Eine dritte saure Aminosäureseitenkette, die in der Exo II Domäne lokalisiert ist, bindet eines der Metallionen über Wasserbrückenmoleküle. All diese Aminosäurereste sind innerhalb der Familie hoch konserviert und werden auch in der erfindungsgemäßen humanen DAN gefunden. Das erfindungsgemäße Polypeptid kann daher als eine Poly(A)-spezifische 3'-Exoribonuclease der RNaseD Familie bezeichnet werden.

Das erfindungsgemäße Polypeptid wird beispielsweise durch Expression der erfindungsgemäßen Nukleinsäure in einem geeigneten Expressionssystem, wie oben bereits beschrieben, nach dem Fachmann allgemein bekannten Methoden herge-

stellt. Als Wirtszellen eignen sich beispielsweise die E. coli Stämme DH5, HB101 oder BL21, der Hefestamm *Saccharomyces cerevisiae*, die Insektenzelllinie Lepidopteran, z.B. von *Spodoptera Frugiperda*, oder tierische Zellen wie COS, Vero, 293 und HeLa, die alle allgemein erhältlich sind.

5

Insbesondere die genannten Teile des Polypeptids können auch mit Hilfe der klassischen Peptidsynthese (Merrifield-Technik) synthetisiert werden. Sie eignen sich insbesondere zur Gewinnung von Antisera, mit deren Hilfe geeignete Genexpressionsbanken durchsucht werden können, um so zu weiteren funktionellen Varianten des erfindungsgemäßen Polypeptids zu gelangen.

10

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung bezieht sich daher auf ein Verfahren zur Herstellung eines erfindungsgemäßen Polypeptids, wobei eine erfindungsgemäße Nukleinsäure in einer geeigneten Wirtszelle exprimiert und gegebenenfalls isoliert wird.

15

Ein anderer Gegenstand der vorliegenden Erfindung bezieht sich auch auf Antikörper, die mit dem erfindungsgemäßen Polypeptid spezifisch reagieren, wobei die oben genannten Teile des Polypeptids entweder selbst immunogen sind oder durch Koppelung an geeignete Träger, wie z.B. bovines Serumalbumin, immunogen gemacht bzw. in ihrer Immunogenität gesteigert werden können.

20

Die Antikörper sind entweder polyklonal oder monoklonal. Die Herstellung, die auch einen Gegenstand der vorliegenden Erfindung darstellt, erfolgt beispielsweise nach allgemein bekannten Methoden durch Immunisieren eines Säugetiers, beispielsweise eines Kaninchens, mit dem erfindungsgemäßen Polypeptid oder den genannten Teilen davon, gegebenenfalls in Anwesenheit von z.B. Freund's Adjuvant und/oder Aluminiumhydroxidgelen (s. z.B. Diamond, B.A. et al. (1981) *The New England Journal of Medicine*, 1344). Die im Tier aufgrund einer immunologischen Reaktion entstandenen polyklonalen Antikörper lassen sich anschließend nach allgemein bekannten Methoden leicht aus dem Blut isolieren und z.B. über Säulenchromatographie reinigen. Bevorzugt wird eine Affinitätsreinigung der Antikörper, bei der bei-

30

spielsweise das C-terminale DAN-Fragment an eine NHS-aktivierte HiTrap-Säule gekoppelt wurde.

Monoklonale Antikörper können beispielsweise nach der bekannten Methode von Winter & Milstein (Winter, G. & Milstein, C. (1991) Nature, 349, 293) hergestellt werden.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist auch ein Arzneimittel, das eine erfindungsgemäße Nukleinsäure oder ein erfindungsgemäßes Polypeptid und gegebenenfalls geeignete Zusatz- oder Hilfsstoffe enthält und ein Verfahren zur Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung von Krebs, Autoimmunkrankheiten, insbesondere Multiple Sklerose oder Rheumatoide Arthritis, Alzheimer-Krankheit, Allergien, insbesondere Neurodermitis, Typ I Allergien oder Typ IV Allergien, Arthrose, Atherosklerose, Osteoporose, akute und chronische Infektionskrankheiten und/oder Diabetis und /oder zur Beeinflussung des Zellmetabolismus, insbesondere bei der Immunsuppression, vor allem bei Transplantationen, bei dem eine erfindungsgemäße Nukleinsäure, beispielsweise eine sogenannten Antisense-Nukleinsäure, oder ein erfindungsgemäßes Polypeptid mit pharmazeutisch annehmbaren Zusatz- und/oder Hilfsstoffen formuliert wird.

Für die gentherapeutische Anwendung beim Menschen ist vor allem ein Arzneimittel geeignet, das die erfindungsgemäße Nukleinsäure in nackter Form oder in Form eines der oben beschriebenen gentherapeutisch wirksamen Vektoren oder in mit Liposomen komplexierter Form enthält.

Als geeignete Zusatz- und/oder Hilfsstoffe eignen sich z.B. eine physiologische Kochsalzlösung, Stabilisatoren, Proteinaseinhibitoren, Nukleaseinhibitoren etc.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist auch ein Diagnostikum enthaltend eine erfindungsgemäße Nukleinsäure, ein erfindungsgemäßes Polypeptid oder erfindungsgemäße Antikörper und gegebenenfalls geeignete Zusatz- und/oder Hilfsstoffe und ein Verfahren zur Herstellung eines Diagnostikums zur Diagnose von

Krebs, Autoimmunkrankheiten, insbesondere Multiple Sklerose oder Rheumatoide Arthritis, Alzheimer-Krankheit, Allergien, insbesondere Neurodermitis, Typ I Allergien oder Typ IV Allergien, Arthrose, Atherosklerose, Osteoporose, akute und chronische Infektionskrankheiten und /oder Diabetis und/oder zur Analyse des Zellmetabolismus, insbesondere des Immunstatus, vor allem bei Transplantationen, bei dem eine erfindungsgemäße Nukleinsäure, ein erfindungsgemäßes Polypeptid oder erfindungsgemäße Antikörper mit geeigneten Zusatz- und/oder Hilfsstoffen versetzt werden.

Beispielsweise können gemäß der vorliegenden Erfindung anhand der erfindungsgemäßen Nukleinsäure ein Diagnostikum auf der Basis der Polymerasekettenreaktion (PCR-Diagnostik, z.B. gemäß EP-0200362) oder eines Northern Blots, wie in Beispiel 5 näher beschrieben, hergestellt werden. Diese Tests beruhen auf der spezifischen Hybridisierung der erfindungsgemäßen Nukleinsäure mit dem komplementären Gegenstrang üblicherweise der entsprechenden mRNA. Die erfindungsgemäße Nukleinsäure kann hierbei auch modifiziert sein, wie z.B. in EP0063879 beschrieben. Vorzugsweise wird ein erfindungsgemäßes DNA-Fragment mittels geeigneter Reagenzien, z.B. radioaktiv mit α -P³²-dATP oder nicht-radioaktiv mit Biotin, nach allgemein bekannten Methoden markiert und mit isolierter RNA, die vorzugsweise an geeignete Membranen aus z.B. Zellulose oder Nylon gebunden wurde, inkubiert. Zudem ist es vorteilhaft, die isolierte RNA vor der Hybridisierung und Bindung an eine Membran der Größe nach, z.B. mittels Agarose-Gelelektrophorese, aufzutrennen. Bei gleicher Menge an untersuchter RNA aus jeder Gewebeprobe kann somit die Menge an mRNA bestimmt werden, die spezifisch durch die Sonde markiert wurde.

Ein weiteres Diagnostikum enthält das erfindungsgemäße Polypeptid bzw. die oben näher beschriebenen immunogenen Teile davon. Das Polypeptid bzw. Teile davon, die vorzugsweise an eine Festphase, z.B. aus Nitrocellulose oder Nylon, gebunden sind, können beispielsweise mit der zu untersuchenden Körperflüssigkeit z.B. Blut, in vitro in Berührung gebracht werden, um so beispielsweise mit Autoimmunantikör-

per reagieren zu können. Der Antikörper-Peptid-Komplex kann anschließend beispielsweise anhand markierter Antihuman-IgG- oder Antihuman-IgM-Antikörper nachgewiesen werden. Bei der Markierung handelt es sich beispielsweise um ein Enzym, wie Peroxidase, das eine Farbreaktion katalysiert. Die Anwesenheit und die
5 Menge an anwesenden Autoimmunantikörpern kann somit über die Farbreaktion leicht und schnell nachgewiesen werden.

Ein anderes Diagnostikum enthält die erfindungsgemäßen Antikörper selbst. Mit Hilfe dieser Antikörper kann beispielsweise eine Gewebeprobe des Menschen leicht
10 und schnell dahingehend untersucht werden, ob das betreffende Polypeptid vorhanden ist. In diesem Fall sind die erfindungsgemäßen Antikörper beispielsweise mit einem Enzym, wie oben bereits beschrieben, markiert. Der spezifische Antikörper-Peptid-Komplex kann dadurch leicht und ebenso schnell über eine enzymatische Farbreaktion nachgewiesen werden.

15 Ein anderer Gegenstand der vorliegenden Erfindung betrifft auch einen Test zur Identifizierung funktioneller Interaktoren, wie z.B. Inhibitoren oder Stimulatoren, enthaltend eine erfindungsgemäße Nukleinsäure, ein erfindungsgemäßes Polypeptid oder die erfindungsgemäßen Antikörper und gegebenenfalls geeignete Zusatz-
20 und/oder Hilfsstoffe.

Ein geeigneter Test zur Identifizierung funktioneller Interaktoren ist z.B. das sogenannte „Two-Hybrid System“ (Fields, S. & Sternglanz, R. (1994) Trends in Genetics, 10, 286). Bei diesem Test wird eine Zelle, beispielsweise eine Hefezelle, mit einem
25 oder mehreren Expressionsvektoren transformiert oder transfiziert, die ein Fusionsprotein exprimieren, das das erfindungsgemäße Polypeptid und eine DNA-Bindedomäne eines bekannten Proteins, beispielsweise von Gal4 oder LexA aus E. coli, enthält und/oder ein Fusionsprotein exprimieren, das ein unbekanntes Poly-
peptid und eine Transkriptions-Aktivierungsdomäne, beispielsweise von Gal4, Herpesvirus VP16 oder B42, enthält. Zudem enthält die Zelle ein Reportergen, bei-
30 spielsweise das LacZ-Gen aus E. coli, „Green Fluorescence Protein“ oder die Aminosäure-Biosynthesegene der Hefe His3 oder Leu2, das durch regulatorische Se-

quenzen, wie z.B. den *lexA*-Promotor/Operator oder durch eine sogenannte „Upstream Activation Sequence“ (UAS) der Hefe kontrolliert wird. Das unbekannte Polypeptid wird beispielsweise durch ein DNA-Fragment kodiert, das aus einer Genbank, beispielsweise aus einer humanen Genbank, stammt. Üblicherweise wird
5 gleich eine cDNA-Genbank mit Hilfe der beschriebenen Expressionsvektoren in Hefe hergestellt, so daß der Test unmittelbar danach durchgeführt werden kann.

Beispielsweise wird in einem Hefe-Expressionsvektor die erfindungsgemäße Nukleinsäure in funktioneller Einheit an die Nukleinsäure kodierend für die *lexA*-DNA-Bindedomäne kloniert, so daß ein Fusionsprotein aus dem erfindungsgemäßen Po-
10 lypeptid und der *LexA*-DNA-Bindedomäne in der transformierten Hefe exprimiert wird. In einem anderen Hefe-Expressionsvektor werden cDNA-Fragmente aus einer cDNA-Genbank in funktioneller Einheit an die Nukleinsäure kodierend für die Gal4-Transkriptions-Aktivierungsdomäne kloniert, so daß ein Fusionsprotein aus einem
15 unbekannten Polypeptid und der Gal4-Transkriptions-Aktivierungsdomäne in der transformierten Hefe exprimiert wird. Die mit beiden Expressionsvektoren transformierte Hefe, die beispielsweise *Leu2⁻* ist, enthält zusätzlich eine Nukleinsäure, die für *Leu2* kodiert, und durch den *LexA*-Promotor/Operator kontrolliert wird. Im Falle einer funktionellen Interaktion zwischen dem erfindungsgemäßen Polypeptid und
20 dem unbekannten Polypeptid bindet die Gal4-Transkriptions-Aktivierungsdomäne über die *LexA*-DNA-Bindedomäne an den *LexA*-Promotor/Operator, wodurch dieser aktiviert und das *Leu2*-Gen exprimiert wird. Dies hat zur Folge, daß die *Leu2⁻* Hefe auf Minimalmedium, das kein Leucin enthält, wachsen kann.

Bei Verwendung des LacZ- bzw. „Green Fluorescence Protein“-Reportergens an-
25 stelle eines Aminosäure-Biosynthesegens kann die Aktivierung der Transkription dadurch nachgewiesen werden, daß sich blau- bzw. grün-fluoreszierende Kolonien bilden. Die Blau- bzw. Fluoreszenzfärbung läßt sich aber auch leicht im Spectrophotometer z.B. bei 585 nM im Falle einer Blaufärbung quantifizieren.

30 Auf diese Weise können Expressionsgenbanken leicht und schnell auf Polypeptide durchsucht werden, die mit dem erfindungsgemäßen Polypeptid interagieren. An-

schließlich können die gefundenen neuen Polypeptide isoliert und weiter charakterisiert werden.

Eine weitere Anwendungsmöglichkeit des „Two-Hybrid-Systems“ ist die Beeinflussung der Interaktion zwischen dem erfindungsgemäßen Polypeptid und einem bekannten oder unbekannten Polypeptid durch weitere Substanzen, wie z.B. chemische Verbindungen. Auf diese Weise lassen sich auch leicht neue wertvolle chemisch synthetisierbare Wirkstoffe auffinden, die als Therapeutikum eingesetzt werden können. Die vorliegende Erfindung ist daher nicht nur auf ein Verfahren zum Auffinden von polypeptidartigen Interaktoren bestimmt, sondern erstreckt sich auch auf ein Verfahren zum Auffinden von Substanzen, die mit dem oben beschriebenen Protein-Protein-Komplex interagieren können. Derartige peptidartige, wie auch chemische Interaktoren werden daher im Sinne der vorliegenden Erfindung als funktionelle Interaktoren bezeichnet, die eine inhibierende oder eine stimulierende Wirkung haben können.

Eine weitere Anwendungsmöglichkeit des erfindungsgemäßen Polypeptids ist der Poly(A)-spezifische Abbau von Nukleinsäuren, insbesondere von mRNA. Der Poly(A)-spezifische Abbau von Nukleinsäuren kann insbesondere in Forschungslabors Verwendung finden.

Die nachfolgenden Figuren und Beispiele sollen die Erfindung näher erläutern, ohne sie zu beschränken.

Beschreibung der Figuren und den wichtigsten Sequenzen

SEQ 11 zeigt die Aminosäuresequenz der humanen DAN mit Domänen für Exo I (ADFFAIDGEFSGIS), Exo II LVIGHNMLLDVMHTVH) und Exo III (SEQLHEAGYDAYITGLC).

SEQ 12 zeigt die Nukleinsäuresequenz der humanen DAN einschließlich Start- (Pos. 58) und Stoppkodon (Pos. 1977) mit anschließender 3'UTR.

Fig. 1 zeigt das Elutionsprofil der humanen DAN an MonoQ (Fig. 3A) und SDS-PAGEs (Fig. 1B und 1C)

Fig. 2 zeigt einen Western-Blot von rekombinanter humaner DAN und nativer boviner DAN

Fig. 3 zeigt die Deadenylierung von mRNA, die Akkumulierung von deadenylierter RNA und den Einfluß von PAB1

Fig. 4 zeigt einen Vergleich bekannter Nucleasen mit der erfindungsgemäßen humanen DAN.

Beispiele

1. Identifizierung von humanen DAN cDNA-Klonen

Die Reinigung von boviner DAN wurde, wie bei Körner, G. & Wahle, E. (1997), supra, beschrieben, wie folgt durchgeführt:

Alle Schritte der Reinigung wurden bei 4°C durchgeführt. Zwischen den Reinigungsschritten wurden die Proben in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C eingefroren. Folgender Basispuffer wurde benutzt: 50 mM Tris/HCl, 1 mM EDTA, 10 % (v/v) Glycerin, 1 mM Dithiothreitol, 0,4 µg/ml Leupeptinhemisulfat, 0,7 µg/ml Pepstatin, 0,5 mM Phenylmethylsulfonylfluorid, 0,02 % (v/v) Nonidet P-40, pH 7,9. Bei den verschiedenen Reinigungsschritten wurden diesem Basispuffer unterschiedliche Konzentrationen KCl wie unten beschrieben zugesetzt.

Frischer Kalbsthymus wurde von einem örtlichen Schlachthaus bezogen, auf Eis transportiert und bei -80°C gelagert. Ein kg wurde in 2 l Basispuffer mit 50 mM KCl aufgetaut und in einem Waring Blendar Homogenizator zunächst mit kleiner, dann mit mittlerer und schließlich mit höchster Geschwindigkeit homogenisiert. Das Ho-

mogenisat wurde 1 h bei 16000 x g zentrifugiert und der Überstand durch eine weitmaschige Gaze dekantiert (Wahle, E., J. Biol. Chem., 266, 1991).

Dieser Extrakt aus Kalbsthymus wurde auf eine DEAE-Sepharose FF Säule (Säulenvolumen 4 l) aufgetragen und mit einem Salzgradienten über das 2,5-fache Säulenvolumen von 50 bis 600 mM KCl von der Säule mit einer Flußrate von 3 l/h eluiert. Aktive Fraktionen wurden bei einer Salzkonzentration zwischen 75 und 200 mM KCl von der Säule eluiert. Die Fraktionen wurden gesammelt, vereinigt, mit Ammoniumsulfat bis zu einer 30% gesättigten Lösung versetzt und für 1,5 h auf Eis gerührt. Nach einer Zentrifugation (30 min, 10800 x g, gilt für alle unten erwähnten Zentrifugationsschritte) wurde der Überstand auf 50 %-ige Sättigung mit Ammoniumsulfat eingestellt, erneut auf Eis gerührt und zentrifugiert. Das Sediment wurde in 400 ml Basispuffer mit 50 mM KCl resuspendiert und für 10 h gegen 2 x 4,5 l Basispuffer dialysiert und erneut zentrifugiert. Eine 1,4 l Sepharose-Blue Säule (7 x 36 cm) wurde mit Basispuffer mit 50 mM KCl äquilibriert und der dialysierte Extrakt auf die Säule aufgetragen. Die Säule wurde mit 1,5 Bettvolumina von Basispuffer mit 250 mM KCl gewaschen und mit einem Bettvolumen Basispuffer mit 1 M KCl eluiert (Flußgeschwindigkeit 2 l/h).

Die aktiven Fraktionen von zwei Präparationen aus jeweils 1,2 kg Kalbsthymus wurden zusammengeführt und mit Ammoniumsulfat (60% Sättigung) gefällt. Nach der Zentrifugation wurde das Sediment in 200 ml Basispuffer mit 50 mM KCl aufgenommen, 12 h gegen 3 x 4 l des selben Puffers dialysiert und in zwei Portionen auf eine Heparin-Sepharose Säule (2,5 x 37 cm) aufgetragen. Die Säule wurden mit 1,5 Bettvolumina Basispuffer mit 50 mM KCl gewaschen und anschließend mit 10 Bettvolumina in einem Gradienten bis 500 mM KCl (Flußgeschwindigkeit: 145 ml/h) eluiert. Die DAN Aktivität eluierte zwischen 80 und 150 mM KCl. Die aktiven Fraktionen wurden vereinigt und gegen Basispuffer mit 30 mM KCl für 4 h dialysiert. Das Dialysat wurde abzentrifugiert und in zwei Portionen an einer MonoQ FPLC Säule chromatographiert (Bettvolumen 8 ml). Die Säule wurde mit zwei Bettvolumen Basispuffer mit 50 mM KCl gewaschen und anschließend mit einem Gradienten über 320 ml mit einer steigenden Salzkonzentration (Endkonzentration: 500 mM KCl,

Flußgeschwindigkeit: 2,5 ml/h) von der Säule eluiert. Die DAN-Aktivität eluierte bei ca. 160 mM KCl. Die aktiven Fraktionen (40 ml) wurden vereinigt und für 4 h gegen 2 l Basispuffer mit 30 mM KCl dialysiert, zentrifugiert und auf eine weitere MonoQ-Säule (1 ml Bettvolumen, Flußgeschwindigkeit: 0,9 ml/h) aufgetragen. Die an die
5 Säule gebundene DAN-Aktivität wurde mit Basispuffer mit 500 mM KCl eluiert und in vier Portionen auf eine Superdex HR 10/30 FPLC Säule (äquilibriert mit Basispuffer mit 300 mM KCl, Flußgeschwindigkeit: 0,15 ml/h) aufgetragen (Körner, Ch. G. & Wahle, E. (1997), supra)

10 Verschiedene Fraktionen einer Superdex-Säule, die die DAN Aktivität enthielten, wurden gesammelt und über eine Phenyl-Superose-Säule getrennt (Körner, G. & Wahle, E. (1997), supra). Die aktiven Fraktionen wurden gesammelt und gegen Puffer (50 mM Tris HCl, pH 7,9, 1mM EDTA, 10% (v/v) Glycerin, 1 mM Dithiothreitol, 0,4 µg/ml Leupeptin-Hemisulfat, 0,7 µg/ml Pepstatin, 0,5 mM Phenylmethylsulfonat
15 (PMSF), 0,02 % (v/v) Nonidet p-40, 50 mM KCl) dialysiert. Nach Zentrifugation wurde das Dialysat an einer 100 µl Smart MonoQ (PC 1.6/5) Säule aufgetragen. Anschließend wurde mit 200 µl Puffer gewaschen. Die gebundenen Proteine wurden in einem Gradienten mit einer steigenden Salzkonzentration (Endkonzentration 500 mM KCl) über ein Volumen von 40 Säulenbettvolumina eluiert. Die Fraktionen, die
20 positiv für die DAN-Aktivität waren, eluierten bei einer KCl-Konzentration von ca. 200 mM KCl. Die zwei Fraktionen mit der höchsten DAN-Aktivität wurden mittels einer SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese analysiert. Anschließend folgte eine in-situ Hydrolyse durch die Protease Lys-C, die Auftrennung über HPLC und Sequenzierung der Peptide. Folgende Sequenzen wurden gefunden:

- 25 1. KSFNFYVFPK,
2. KPFNRSSPD(V/K)K,
3. KYAESYWIQTYADYVG sowie
4. eine Mischung aus: KEQEELNDA und KLFLMRVMD.

Die N-terminale Sequenz der gereinigten bovinen DAN konnte nicht bestimmt werden.
30

Anschließend wurden EST (expressed sequence tags)-Datenbankrecherchen mit Hilfe des BLAST-Programms (NCBI) durchgeführt. Folgende Klone konnten identifiziert werden:

I.M.A.G.E.-Konsortium Klon ID 645295 durch Peptide 1 und 2 und

5 I.M.A.G.E.-Konsortium Klon ID 301901 durch Peptid 3.

Das vollständige Sequenzieren der gefundenen Klone wurde auf einem ABI373A-Sequenziergerät mit dem ABI Dye Terminator Cycle SequencingKit durchgeführt.

10 Hierbei wurde gefunden, daß der I.M.A.G.E.-Konsortium Klon ID 301901 für die 176 C-terminalen Aminosäuren von DAN und den gesamten 3'-UTR kodiert, während I.M.A.G.E.-Konsortium Klon ID 645295 den gesamten ORF und den 5'UTR und einen Teil des 3'-UTR kodiert, was einem Protein von 639 Aminosäuren mit einer molekularen Masse von 73,5 kDa entspricht (SEQ 11). Die 57 Nukleotide, die
15 stromaufwärts vom ersten AUG Codon liegen enthalten kein Stop-Codon im Leserahinter. Die dieses AUG-Codon umgebenden Sequenzen (AGAAUGG) entsprechen den sogenannten Kozak-Regeln (Kozak, 1991), die für den Translationsstart bevorzugte Startsequenzen beschreiben. Ein 3'-UTR von 0,7 kB ist im cDNA-Klon 645295 und ein poly(A)-Schwanz ist am Ende des cDNA-Klons 301901 zu finden. Dem
20 poly(A)-Schwanz geht stromaufwärts das seltene Polyadenylierungssignal AUUAAA voraus. (SEQ 12)

2. Herstellung von Expressionsvektoren

25 Das Plasmid pGMMCS wurde auf folgende Weise konstruiert:

Der T7 Expressionsvektor pGM10 (Martin, 1996), welcher die PABII cDNA-Sequenz (Nemeth, 1996) mit einem N-terminalen Met-Ala-His6-Tag enthielt, wurde mit Xho I und BamH I verdaut und das Fragment, das den 3'-Teil des PAB II enthielt, wurde
30 durch ein Xho I/BamH I-Fragment aus der Multiple Cloning Site vom pBluescript KS (+/-) Plasmid ersetzt. Das resultierende Plasmid enthält eine durch den T7-Promotor kontrollierte Sequenz, die mit Met-AlaHis₆ beginnt und durch den 5'- Teil vom PAB II

und einer Multi Cloning Site gefolgt wird. Eine Nde I Schnittstelle liegt zwischen dem His₆-Tag und der PAB II Sequenz und kann zusammen mit der Multi Cloning Site dafür benutzt werden, um die verbliebene PAB II Sequenz durch jede beliebige kodierende Sequenz zu ersetzen.

5 Das Plasmid pGMMCS301901 wurde auf folgende Weise hergestellt:

Ein Teil der Sequenz des humanen DAN-Klons, der die 176 C-terminalen Aminosäuren enthielt wurde mittels PCR aus dem Klon 301901 mit folgenden Bedingungen amplifiziert:

10 15 Zyklen: 45 s bei 94°C, 45 s bei 54°C und 3,5 min bei 72°C. Pfu-Polymerase und die Primer Nde I 301901: CCATATCCATATGCTTTTCAGTGCCTTTCCTAAC und Xho I 301901: AGTACTCGAGTTACAATGTGTCAGG. Nach Verdau mit Nde I und Xho I wurden die entstandenen cDNA-Fragmente mit dem Qia-Ex-Kit (Qiagen GmbH, Hilden) gereinigt und in den Nde I und Xho I verdauten pGMMCS-Vektor
15 integriert. Die Sequenz wurde mit Hilfe von Sequenzierung bestätigt.

Das Plasmid pGMMCS645295 wurde wie folgt hergestellt:

Die kodierende Sequenz des humanen DAN-Klons wurde mittels PCR aus dem Klon
20 645295 mit folgenden Bedingungen amplifiziert:

20 Zyklen: 45 s bei 94°C, 45 s bei 54°C und 3,5 min bei 72°C. Pfu-Polymerase und die Primer Nde I 645295: AGTGTCGCATATGGAGATAATCAGGAGCA und Xho I 645295: AGTACTCAGCGGTTTGCTGCCCTCA. Das entstandenen Produkt wurde in den Vektor pCR2.1 mit Hilfe des TA-Klonierungs-Kits (Invitrogen ®) kloniert.

25 Nach Verdau mit Nde I und Xho I wurden die entstandenen cDNA-Fragmente mit dem Qia-Ex-Kit (Qiagen) gereinigt und in den Nde I und Xho I verdauten pGMMCS-Vektor integriert. Anschließend wurde der größte Teil der durch PCR generierten Sequenz mit Hilfe eines Verdau mit Dra III und BstE II entfernt und durch das entsprechende Fragment des Originalklons ersetzt. Die neue Sequenz wurde mit Hilfe
30 von Sequenzierung bestätigt.

3. Herstellung von Antikörpern

Antikörper gegen den C-terminalen Teil von humanem DAN wurden wie folgt produziert:

- 5 Das Plasmid pGMMCS301901 wurde in BL21 (pLysC) transformiert. Die Zellen wurden bei 37°C in SOB-Medium mit 200 µg/ml Carbenicillin bis zu einer OD600 von 1,9 inkubiert. Anschließend wurde 200 µM Isopropyl-β-D-Thiogalactosid dazugegeben und für weitere 5 h inkubiert. Die Zellen wurden geerntet und in Puffer A (100 mM NaH₂PO₄, 10 mM Tris, 8M Harnstoff, pH 7,9) aufgenommen. Die Zellen wurden
10 mit Ultraschall lysiert, das Lysat zentrifugiert und mit 3 ml Ni-NTA-Säulenmaterial für 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Das Säulenmaterial wurde in eine Säule gepackt und mit 70 ml Puffer A, pH 6,3 gewaschen. Anschließend wurde mit 15 ml Puffer B (300 mM NaCl, 10% (v/v) Glycerin, 50 mM Tris, 0,01 % (v/v) Nonidet-P40, 8M Harnstoff, pH 7,9) gewaschen. Das Protein wurde auf der Säule zurückgefaltet, indem
15 mit zwei Gradienten der Harnstoffgehalt verringert wurde (45 ml/h, Gradient 1: Puffer B von 8 auf 4 M Harnstoff bei Raumtemperatur, Gradient 2: von 4 auf 0 M Harnstoff bei 4°C). das Protein wurde mit Puffer B, der 500 mM Imidazole enthielt, von der Säule eluiert, gegen Puffer B ohne Harnstoff dialysiert und für die Immunisierung von Kaninchen verwendet.

20

- Die Affinitätsreinigung von Anti-DAN-Antikörper wurde wie folgt vorgenommen: Das C-terminale DAN-Fragment wurde an eine NHS-aktivierte HiTrap-Säule (1 ml Volumen, Pharmacia, Freiburg) nach Herstelleranweisungen gekoppelt. 3 ml Serum wurden auf die Säule aufgetragen und nach Herstellerangaben eluiert. 300 µg/ml
25 BSA und 0,02% (w/v) NaN₃ wurden den Fraktionen zugesetzt und der Puffer wurde mittels Dialyse ausgetauscht.

4. Expression und Reinigung von humaner DAN

- 30 Humane DAN wurde in E. coli als Fusionsprotein mit N-terminalem His-Tag (Met-Ala-His₆-Tag) folgendermaßen exprimiert:

Das Plasmid pGMMCS645295 wurde in BL21 (pLysC) transformiert. Die Zellen wurden in 50 ml LB Medium mit 100 µg/ml Carbenicillin und 24 µg/ml Chloramphenicol bei 37°C angezogen und anschließend in eine 500 ml Kultur ohne Chloramphenicol überführt und bei 33°C weiterinkubiert. Nach dem Erreichen einer OD600 von 1,3 wurden 100 µM Isopropyl-β-D-Thiogalactosid hinzugefügt und die Kultur für eine weitere Stunde inkubiert. Die Zellen wurden geerntet und in Puffer A (50 mM Tris, 300 mM KCl, 0,1 mM MgAc, 1mM β-Mercaptoethanol, 0,4 µg/ml Leupeptin, 0,7 mg/ml Pepstatin, 0,5 mM PMSF, pH 7,9) aufgenommen. Die Zellen wurden mit Ultraschall lysiert, das Lysat zentrifugiert und mit 2 ml Ni²⁺-NTA-Säulenmaterial für 2 h bei 4°C inkubiert. Das Säulenmaterial wurde in eine Säule gepackt und mit 25 ml Puffer A und anschließend mit 20 ml Puffer B (Puffer A und 10% (v/v) Glycerin, 0,02 % (v/v) Nonidet-P40, ohne Magnesium, pH 6,3) gewaschen. Anschließend wurde das Protein mit 5 ml Puffer C (Puffer B mit 500 mM Imidazol) eluiert. Darauf folgte eine Dialyse gegen Puffer D (50 mM Tris, 20 mM KCl, 1mM EDTA, 5 mM PMSF, 10% (v/v) Glycerin, 0,02 (v/v) Nonidet-P40, pH 7,9). Die Präparation wurde zentrifugiert und auf eine MonoQ-Säule (1 ml Bettvolumen) aufgetragen. Anschließend wurde die Säule mit 5 Bettvolumen Puffer mit 50 mM KCl gewaschen und die Säule mit einem Gradienten über 40 Bettvolumen mit einer Endkonzentration von 500 mM KCl eluiert. Die DAN-Aktivität eluierte in einem scharfen Peak bei ca. 190 mM KCl (Fig. 1A).

Die Reinigung führte zu einer nahezu homogenen Präparation eines Proteins mit der erwarteten molekularen Masse (Fig. 1B und 1C). Das Protein weist eine poly(A)-spezifische 3'-Exoribonuclease-Aktivität auf (siehe Beispiel 6). Daraus folgt, daß der gefundene cDNA-Klon für eine humane DAN kodiert.

5. Northern-Blot Analyse

RNA wurde aus HeLa-Zellen nach einer Methode von Chomczynski, P. & Sacchi, N. (1987) Anal. Biochem. 162, 156 isoliert. Poly(A) mRNA wurde mit Hilfe von oligo(dT)-Zellulose nach einer Methode von Sambrook, J. et al. (1989) Molecular Cloning. A Laboratory Manual, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold

Spring Harbor, N.Y., gereinigt. Die resultierende RNA wurde auf einem 1%igen Agarose-Formaldehyd-Gel aufgetrennt, auf eine Hybond N+ Membran von der Fa. Amersham Buchler, Braunschweig durch Kapillar-Blot transferiert und durch Inkubation für 2 h bei 80°C auf der Membran fixiert. Die für die humane DAN kodierende Sequenz wurde mittels PCR amplifiziert, mit α -³²P-dATP durch Random-Priming markiert und als Sonde benutzt. Die Hybridisierung wurde wie beschrieben durchgeführt (Ausubel) und die Membran wurde unter hoher Stringenz gewaschen. Die Northern-Blot-Analyse mit poly(A)⁺ RNA aus HeLa Zellen zeigte ein einziges 3,1 kB Fragment, das mit der DAN-Probe hybridisierte. Diese Größe stimmt gut mit der Größe des cDNA-Klons überein.

6. DAN-Aktivitätstest

Der Assay für die DAN-Aktivität wurde wie beschrieben durchgeführt (Körner, Chr G. & Wahle, E. (1997), supra). SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) wurde nach Laemmli, U.K. (1970) Nature 227, 680 durchgeführt.

Wie das bovine Enzym ist die rekombinante DAN in Abhängigkeit von der Neutralisierung von Phosphatladungen unter zwei verschiedenen Reaktionsbedingungen aktiv. In der Abwesenheit von Salz ist die Aktivität vollständig von der Anwesenheit von Spermidin mit einem Konzentrationsoptimum von 1mM abhängig. Unter diesen Bedingungen ist die spezifische Aktivität der rekombinanten DAN (79.000 U/mg) nicht signifikant unterschiedlich von der Aktivität gereinigter boviner DAN (110.000 U/mg). In der Anwesenheit von Spermidin wird die Aktivität von DAN durch Salz gehemmt. In der Abwesenheit von Spermidin ist die Aktivität des Enzyms mit einem Konzentrationsoptimum von 150 mM Kaliumacetat von Salz abhängig. Bovine DAN verhält sich auch unter diesen Bedingungen ähnlich.. Allerdings ist die spezifische Aktivität des rekombinanten Proteins (960 U/mg) unter diesen Bedingungen geringer, als die des aus Kalbsthymus gereinigten Enzyms (8070 U/mg). Dieser Unterschied ist durch eine posttranslationale Modifikation oder durch kontaminierende Proteine in der Präparation des bovinen Enzyms erklärbar.

Wurde eine mit einem Cap versehene, polyadenylierte RNA mit den DAN-Präparationen in der Anwesenheit von Salz inkubiert, wurde der poly(A)-Schwanz degradiert und vollständig deadenylierte RNA vorübergehend accumuliert (Fig. 3). Wurde der Assay in Anwesenheit von PABI durchgeführt, wurde die Aktivität teilweise inhi-
5 se inhiert und stufenweiser Abbau des poly(A)-Schwanzes beobachtet. Die vorherrschenden Abbauprodukte differierten in der Länge um ca. 30 Nukleotide, welches offensichtlich durch die PABI-Bindung verursacht wurde. Diese Ergebnisse stimmen mit den Untersuchungen für bovines Protein überein (Körner Chr. & Wahle, E. (1997, supra). Zusammengefaßt zeigen die Ergebnisse, daß das rekombinante
10 Protein eine poly(A)-spezifische 3'-Exoribonuclease ist.

7. Western-Blot Analysen

Western-Blot Analysen wurden wie folgt durchgeführt: Die Proteine wurden mittels
15 SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Nitrozellulose-Membran mit Hilfe der Semidry-Methode (Kyse-Andersen, 1984) übertragen. Die Blots wurden mit TNT-Puffer (20 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 0,05% (v/v) Tween 20, pH 7,5) mit 5% (w/v) entfetteter Trockenmilch inkubiert. Der gleiche Puffer wurde für die Inkubation mit Antiserum und die Waschschr-
20 itte verwendet. Die Blots wurden mit den Antikörpern für 2-3 h bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend gewaschen. Die gebundenen Antikörper wurden mittels eines Peroxidase-konjugierten Schwein-anti-Kaninchen-Antikörpers (DAKO, Glostrup, Denmark) und Chemilumineszenz-Färbung (SuperSignal-Kit, Pierce) nachgewiesen.

25 Die Analysen zeigen, daß Kaninchen-Antikörper, die gegen ein C-terminales Fragment von DAN erzeugt wurden, aus teilgereinigten Fraktionen DAN präzipitieren können. Die Antikörper erkennen im Western-Blot sowohl bovines, als auch humanes DAN (Fig. 4). In diesem Experiment erscheint das rekombinante DAN etwas größer als das Enzym in SDS-Lysaten aus HeLa-Zellen, was durch die Einführung
30 des Tag (1004 Da) in die Sequenz erklärt werden kann. Wenn das erste AUG in der cDNA-Sequenz nicht das benutzte Start-Codon sein sollte, hätte die natürliche DAN aus HeLa-Zellen mindestens 1260 Da größer als das mit einem Tag versehene re-

kombinante Protein sein müssen. Auch diese Ergebnisse bestätigen eine Benutzung der ersten AUG-Sequenz im cDNA-Klon als Start-Codon in vivo.

Patentansprüche

1. Nukleinsäure kodierend für eine humane deadenylierende Nuclease (DAN) mit einer Aminosäuresequenz gemäß SEQ 11 oder eine funktionelle Variante davon,
5 und Teile davon mit mindestens 8 Nukleotiden, wobei SEQ 11 Teil des Anspruchs ist.
2. Nukleinsäure nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Nukleinsäure eine DNA oder RNA, vorzugsweise eine doppelsträngige DNA ist.
- 10 3. Nukleinsäure nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß die Nukleinsäure eine DNA mit einer Nukleinsäuresequenz gemäß SEQ 12 von Position 58 bis 1977 ist, wobei SEQ 12 Teil des Anspruchs ist.
- 15 4. Nukleinsäure nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß die Nukleinsäure eine oder mehrere nicht-kodierende Sequenzen und/oder eine polyA-Sequenz enthält.
- 20 5. Nukleinsäure nach einem der Ansprüche 1-4, dadurch gekennzeichnet, daß die Nukleinsäure in einem Vektor, vorzugsweise in einem Expressionsvektor oder gentherapeutisch wirksamen Vektor, enthalten ist.
6. Verfahren zur Herstellung einer Nukleinsäure nach einem der Ansprüche 1-4, dadurch gekennzeichnet, daß die Nukleinsäure chemisch synthetisiert oder anhand
25 einer Sonde aus einer Genbank isoliert wird.
7. Polypeptid mit einer Aminosäuresequenz gemäß SEQ 11 oder eine funktionelle Variante davon, und Teile davon mit mindestens 6 Aminosäuren.
- 30 8. Verfahren zur Herstellung eines Polypeptids gemäß Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß eine Nukleinsäure gemäß einem der Ansprüche 1-5 in einer geeigneten Wirtszelle exprimiert wird.

9. Antikörper gegen ein Polypeptid gemäß Anspruch 7.
10. Verfahren zur Herstellung eines Antikörpers gemäß Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß ein Säugetier mit einem Polypeptid gemäß Anspruch 7 immunisiert und gegebenenfalls die entstandenen Antikörper isoliert werden.
11. Arzneimittel enthaltend eine Nukleinsäure gemäß einem der Ansprüche 1-5 oder ein Polypeptid gemäß Anspruch 7 und gegebenenfalls pharmazeutisch annehmbare Zusatz- und/oder Hilfsstoffe.
12. Verfahren zur Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung von Krebs, Autoimmunkrankheiten, insbesondere Multiple Sklerose oder Rheumatoide Arthritis, Alzheimer-Krankheit, Allergien, insbesondere Neurodermitis, Typ I Allergien oder Typ IV Allergien, Arthrose, Atherosklerose, Osteoporose, akute und chronische Infektionskrankheiten und/oder Diabetis und/oder zur Beeinflussung des Zellmetabolismus, insbesondere bei der Immunsuppression, vor allem bei Transplantationen, dadurch gekennzeichnet, daß eine Nukleinsäure gemäß einem der Ansprüche 1-5 oder ein Polypeptid gemäß Anspruch 7 oder Antikörper gemäß Anspruch 9 mit einem pharmazeutisch annehmbaren Zusatz- und/oder Hilfsstoff formuliert wird.
13. Diagnostikum enthaltend eine Nukleinsäure gemäß einem der Ansprüche 1-5 oder ein Polypeptid gemäß Anspruch 7 oder Antikörper gemäß Anspruch 9 und gegebenenfalls geeignete Zusatz- und/oder Hilfsstoffe.
14. Verfahren zur Herstellung eines Diagnostikums zur Diagnose von Krebs, Autoimmunkrankheiten, insbesondere Multiple Sklerose oder Rheumatoide Arthritis, Alzheimer-Krankheit, Allergien, insbesondere Neurodermitis, Typ I Allergien oder Typ IV Allergien, Arthrose, Atherosklerose, Osteoporose, akute und chronische Infektionskrankheiten und/oder Diabetis und/oder zur Analyse des Zellmetabolismus, insbesondere des Immunstatus, vor allem bei Transplantationen, dadurch gekennzeichnet, daß eine Nukleinsäure gemäß einem der Ansprüche 1-5 oder ein Poly-

peptid gemäß Anspruch 7 oder Antikörper gemäß Anspruch 9 mit einem pharmazeutisch annehmbaren Träger versetzt wird.

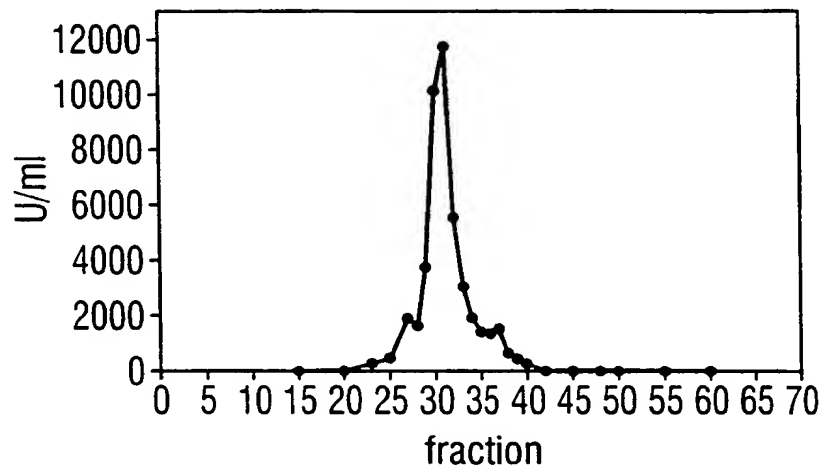
- 5 15. Test zur Identifizierung von funktionellen Interaktoren enthaltend eine Nukleinsäure gemäß einem der Ansprüche 1-5 oder ein Polypeptid gemäß Anspruch 7 oder Antikörper gemäß Anspruch 9 und gegebenenfalls geeignete Zusatz- und/oder Hilfsstoffe.
- 10 16. Verwendung einer Nukleinsäure gemäß einem der Ansprüche 1-5 oder eines Polypeptids gemäß Anspruch 7 zur Identifizierung funktioneller Interaktoren.
17. Verwendung einer Nukleinsäure gemäß einem der Ansprüche 1-5 zum Auffinden von Varianten der humanen DAN, dadurch gekennzeichnet, daß eine Genbank mit der genannten Nukleinsäure abgesucht und die gefundene Variante isoliert wird.
- 15 18. Verwendung eines Polypeptids gemäß Anspruch 7 zum poly(A)-spezifischem Abbau von Nukleinsäuren, insbesondere von mRNA.

20

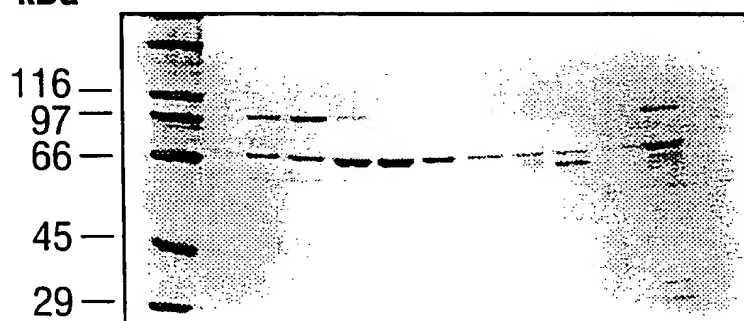
25

30

1 / 4

Fig. 1A**Fig. 1B**

kDa 25 28 29 30 31 32 33 34 35 38 Load

**Fig. 1C**

kDa 25 28 29 30 31 32 33 34 35 38 Load

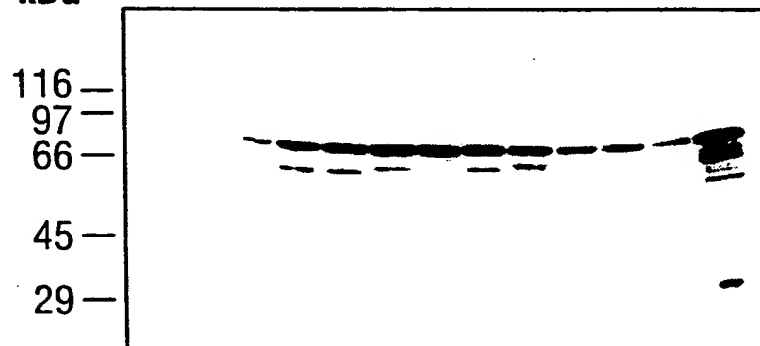
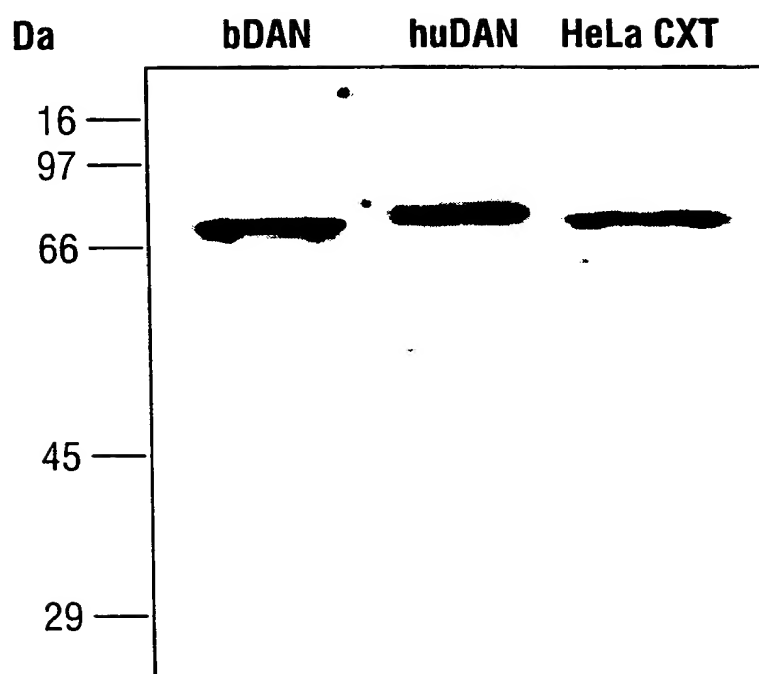
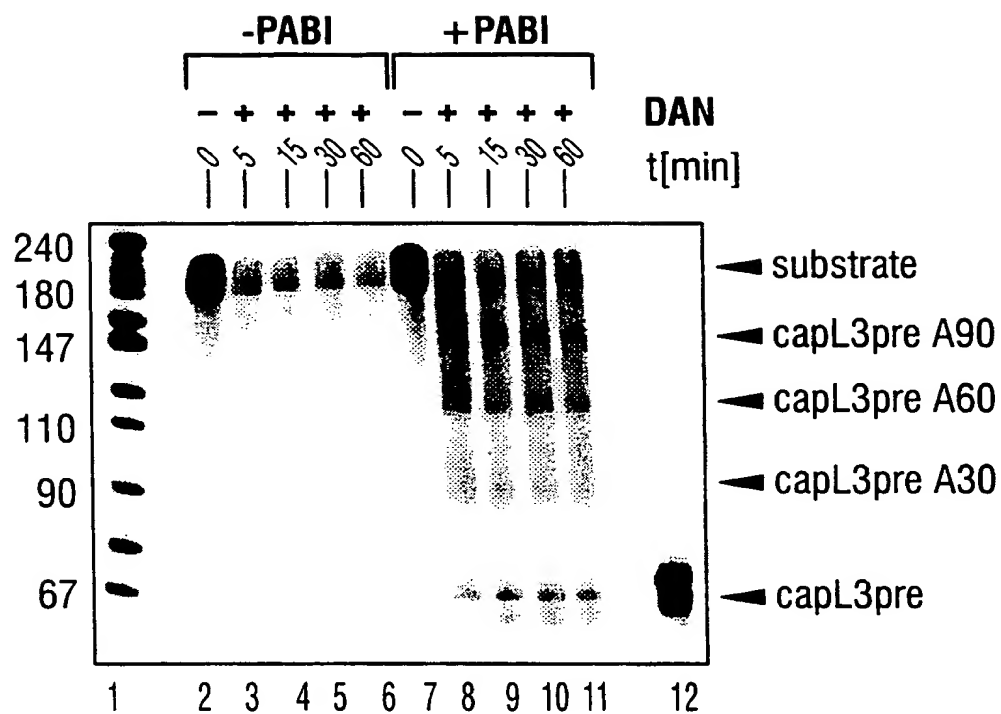




Fig. 2



3 / 4

Fig. 3



4 / 4

Fig. 4

huDAN	22	A	D	F	F	A	I	D	G	E	F	S	G	I	S	35
K10C81	23	C	D	F	V	A	I	D	F	E	F	L	G	L	D	36
A. thaliana		A	D	F	V	A	I	D	L	E	M	T	G	V	T	
PAN2	904	G	T	L	V	A	I	D	A	E	F	V	S	L	Q	917
RNaseD	22	F	P	A	I	A	L	D	T	E	F	V	R	T	R	35
EcoDNAPol1	349	A	P	V	F	A	F	D	T	E	T	D	S	L	D	362

↑ ↑
Exol

huDAN	283	L	V	I	G	H	N	M	L	L	D	V	M	H	T	V	H	298
K10C81	284	L	V	V	G	H	N	S	L	L	D	A	M	Y	M	Y	H	299
A. thaliana		L	I	V	G	H	N	C	F	L	D	I	A	H	V	Y	S	
PAN2	1011	V	F	V	G	H	G	L	N	N	D	F	K	H	I	N	I	1026
RNaseD	76	T	K	F	L	H	A	G	S	E	D	L	E	V	F	L	N	91
EcoDNAPol1	415	L	K	V	G	Q	N	L	K	Y	D	R	G	I	L	A	N	430

↑
ExolII

huDAN	373	S	E	Q	L	H	E	A	G	Y	D	A	Y	I	T	G	L	C	389
K10C81	370	E	N	V	Y	H	N	A	G	F	D	S	Y	V	T	G	E	V	376
A. thaliana		A	G	G	K	H	E	A	G	Y	D	A	F	M	T	G	C	I	
PAN2	1062	Q	E	G	N	H	D	S	I	E	D	A	H	T	A	L	I	L	1078
RNaseD	146	E	R	Q	E	W	Y	A	A	A	D	V	W	Y	L	L	P	I	162
EcoDNAPol1	493	E	E	A	G	R	Y	A	A	E	D	A	D	V	T	L	Q	L	507

↑ ↑
ExolIII



(1) ALLGEMEINE ANGABEN:

(i) ANMELDER:

- (A) NAME: Aventis Research & Technologies GmbH & Co KG
- (B) STRASSE:
- (C) ORT: 65926 Frankfurt
- (D) BUNDESLAND:
- (E) LAND: Deutschland
- (F) POSTLEITZAHL: 65926

(ii) BEZEICHNUNG DER ERFINDUNG: Humane deadenylierende Nuclease, ihre Herstellung und Verwendung

(iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 29

(iv) COMPUTER-LESBARE FASSUNG:

- (A) DATENTRÄGER: Floppy disk
- (B) COMPUTER: IBM PC compatible
- (C) BETRIEBSSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS
- (D) SOFTWARE: WINDOWS 3.1

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 1

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 10
- (B) ART: Aminosäuresequenz
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(v) ART DES FRAGMENTS: inneres Fragment

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 1

KSFNFIYVFPK

10



(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 2

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 - (A) LÄNGE: 11
 - (B) ART: Aminosäuresequenz
 - (C) STRANGFORM: Einzelstrang
 - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid
- (v) ART DES FRAGMENTS: inneres Fragment

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 2

KPFNRSSPDV K

11

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 3

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 - (A) LÄNGE: 11
 - (B) ART: Aminosäuresequenz
 - (C) STRANGFORM: Einzelstrang
 - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid
- (v) ART DES FRAGMENTS: inneres Fragment

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 3

KPFNRSSPDK K

11

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 4

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 - (A) LÄNGE: 16
 - (B) ART: Aminosäuresequenz
 - (C) STRANGFORM: Einzelstrang
 - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid
- (v) ART DES FRAGMENTS: inneres Fragment

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 4

KYAESYWIQT YADYVG

16



(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 5

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 8
- (B) ART: Aminosäuresequenz
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(v) ART DES FRAGMENTS: inneres Fragment

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 5

KEQEELNDA

8

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 6

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 9
- (B) ART: Aminosäuresequenz
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(v) ART DES FRAGMENTS: inneres Fragment

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 6

KLFLMRVMD

9

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 7

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 34
- (B) ART: Nucleotidsequenz
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: sonstige Nucleinsäure: Primer-DNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 7

CCATATCCAT ATGCTTTTCA GTGCCTTTCC TAAC

34

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 8

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 25
- (B) ART: Nucleotidsequenz
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear



(ii) ART DES MOLEKÜLS: sonstige Nucleinsäure: Primer-DNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 8

AGTACTCGAG TTACAATGTG TCAGG

25

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 9

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 29
- (B) ART: Nucleotidsequenz
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: sonstige Nucleinsäure: Primer-DNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 9

AGTGTCGCAT ATGGAGATAA TCAGGAGCA

29

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 10

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 25
- (B) ART: Nucleotidsequenz
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: sonstige Nucleinsäure: Primer-DNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 10

AGTACTCAGC GGTTCGCTGC CCTCA

25

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 11

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 639
- (B) ART: Aminosäuresequenz
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(v) ART DES FRAGMENTS: N-Terminus



(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 11

MEIIRSNFKS	NLHKVYQAIE	EADFFAIDGE	FSGISDGPSV	SALTNGFDTP	EERYQKLKKH	60
SMDFLLFQFG	LCTFKYDYTD	SKYITKSFNF	YVFPKPFNRS	SPDVKFVCQS	SSIDFLASQG	120
FDNFKVFRNG	IPYLNQEEER	QLREQYDEKR	SQANGAGALS	YVSPNTSKCP	VTIPEDQKKF	180
IDQVVEKIED	LLQSEENKNL	DLEPCTGFQR	KLIYQTLNWK	YPKGIVHETL	ETEKKERYIV	240
ISKVDEEERK	RREQQKHAK	QEELNDAVGF	SRVIHAIAIS	GKLVIGHNML	LDVMHTVHQF	300
YCPLPADLSE	FKEMTTCVFP	RLDITKLMS	TQPFKDIINN	TSLAELEKRL	KETPFNPPKV	360
ESAEGFPSYD	TASEQLHEAG	YDAYITGLCF	ISMANYLGSF	LSPPKIHVSA	RSKLIEPPFN	420
KLFLMRVMDI	PYLNLEGPDL	QPKRDHVLHV	TFPKWKTS	LYQLFSAFGN	IQISWIDDT	480
AFVSLSQPEQ	VKIAVNTSKY	AESYRIQTYA	EYMGRKQEEK	QIKRKWTEDS	WKEADSKRLN	540
PQCIPYTLQN	HYRRNSFTA	PSTVGKRNLS	PSQEEAGLED	GVSGEISDTE	LEQTDSCAEP	600
LSEGRKKAKK	LKRMMKELSP	AGSISKNSPA	TLFEVPDITW			639

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 12

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 2941
- (B) ART: Nucleotidsequenz
- (C) STRANGFORM: Doppelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: c-DNA zu m-RNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 12

GAACCGCTGA	GGCGGGCGCG	GGCCCGGGTG	GGGCCAAGGT	TCCGGCCACT	CTGCAGAATG	60
GAGATAATCA	GGAGCAATTT	TAAGAGTAAT	CTTCACAAAG	TGTACCAGGC	CATAGAGGAG	120
GGCGACTTCT	TGCGCATCGA	TGGGGAGTTT	TCAGGAATCA	GTGATGGACC	TTCAGTCTCT	180
GCATTAACAA	ATGGTTTTGA	CACTCCAGAA	GAGAGGTATC	AGAAGCTTAA	AAAGCATTCC	240
ATGGACTTTT	TGCTATTTCA	GTTTGGCCTT	TGCACTTTTA	AGTATGACTA	CACAGATTCA	300
AAGTATATAA	CGAAGTCATT	TAACCTCTAT	GTTTTCCCGA	AACCTTCAA	TAGATCCTCA	360
CCAGATGTCA	AATTTGTTTG	TCAGAGCTCC	AGCATTGACT	TTCTAGCAAG	CCAGGGATTT	420
GATTTTAATA	AAGTTTTTCG	AAATGGAATT	CCATATTTAA	ATCAGGAAGA	AGAAAGACAG	480
TTAAGAGAGC	AGTATGATGA	AAAACGTTCA	CAGGCGAATG	GTGCAGGAGC	TCTGTCCCTAT	540
GTATCTCCTA	ACACTTCAAA	ATGTCCTGTC	ACGATTCCTG	AGGATCAAAA	GAAAGTTTATT	600
GACCAAGTGG	TAGAGAAAAT	AGAGGATTTA	TTACAAAGTG	AAGAAAACAA	GAACTTGGAT	660
TTAGAGCCAT	GTACCGGGTT	CCAAAGAAAA	CTAATTTATC	AGACTTTGAG	CTGGAAGTAT	720
CCGAAAGGCA	TTTCATGTTG	GACTTTAGAA	ACTGAAAAGA	AGGAGCGATA	TATAGTTATC	780
AGCAAAGTAG	ATGAAGAAGA	ACGCAAAAGA	AGAGAGCAGC	AGAAACATGC	CAAAGAACAG	840
GAGGAGCTGA	ATGATGCTGT	GGGATTTTCT	AGAGTCATTC	ACGCCATTGC	TAATTCGGGA	900
AAACTTGTTA	TTGGACACAA	TATGCTCTTG	GACGTCATGC	ACACAGTTCA	TCAGTTCTAC	960
TGCCCTCTGC	CTGCGGACTT	AAGTGAGTTT	AAAGAGATGA	CAACATGTGT	TTTCCCCAGA	1020
CTCTTGATA	CTAAATTGAT	GGCCAGCACA	CAACCTTTTA	AGGATATCAT	TAACAACACA	1080
TCCCTTGCGG	AATTGGAAAA	GCGGTTAAAA	GAGACACCTT	TCAACCTCC	TAAAGTTGAA	1140
AGTGCCGAAG	GTTTTCCAAG	TTATGACACA	GCCTCTGAAC	AACTCCACGA	GGCAGGCTAC	1200
GATGCCATCA	TCACAGGGCT	GTGCTTCATC	TCCATGGCCA	ATTACCTAGG	TTCTTTTCTC	1260
AGCCCTCCAA	AAATTCATGT	GTCTGCCAGA	TCAAAACCTCA	TGAACCTTT	TTTAAACAAG	1320
TTATTTCTTA	TGAGGGTCAT	GGATATCCCC	TATCTAAACT	TGGAAGGACC	AGACTTGCAG	1380
CCTAAACGTG	ATCATGTTCT	CCATGTGACA	TTCCCCAAAG	AATGGAAAAC	CAGCGACCTT	1440
TACCAGCTTT	TCAGTGCCTT	TGGTAACATT	CAGATATCCT	GGATTGATGA	CACATCAGCA	1500
TTTGTTCCTC	TTAGCCAGCC	CGAGCAAGTA	AAGATTGCTG	TCAATACCAG	CAAATATGCA	1560
GAAAGCTATC	GGATCCAAAC	CTATGCTGAA	TATATGGGGA	GAAACAGGA	AGAGAAGCAG	1620
ATCAAAAGAA	AGTGGACTGA	AGATAGCTGG	AAGGAGGCTG	ACAGCAAACG	GTAAACCCC	1680



CAGTGCATAC	CCTACACCCCT	GCAGAATCAC	TATTACCGCA	ACAATAGTTT	TACAGCTCCC	1740
AGCACAGTAG	GAAAGAGAAA	TTTGAGTCCT	AGTCAAGAGG	AAGCTGGCCT	GGAGGACGGA	1800
GTGTCAGGGG	AGATTTCGGA	CACTGAGCTT	GAGCAGACCG	ATTCCTGTGC	AGAGCCCCTC	1860
TCAGAGGGAA	GGAAAAAGGC	CAAGAAATTA	AAAAGAATGA	AGAAGGAGCT	TTCTCCAGCA	1920
GGAAGCATCT	CGAAGAACAG	CCCTGCCACA	CTCTTTGAAG	TTCTTGACAC	ATGGTAACCA	1980
AGACCTGAGG	GCAGCAAACC	GCTGGTGTCTG	TCGCTGTGAG	CAAGAGCCCG	CTGGCACATT	2040
TGGAAGCCGC	ACTGTATTTA	ACTTAATCAA	ATGTGGTATG	GGAGGGGTTG	GAAACCAAGT	2100
TGTCTCCTGG	GGGGGAGAAA	ACAGGTTTTA	TTTTTGTGGC	TGTGGTTTTT	TCCCCTTTTT	2160
AATCTAACTG	CCTGTTGACA	TTGACACTCA	TCACGGTTGT	AGGCTGTTCAT	GAATGTGTAC	2220
GTGCTTAACC	AGTGAATTCC	GTGTTGCTCT	TGTGAGGCCT	TTCTGTTCAT	GACCCAGTGT	2280
GCTTAAGAAC	CTGCCTGATG	GGGAGTGTCTG	GCTGTGAAAT	CTGCAAAAAG	AGCTGACATT	2340
CCAGCTGCTG	TGATCATGAA	TTTGGGGGTG	TACTGTCCTG	CCTGTGCATC	TTCTCGCACT	2400
GAGATTTTGA	GGCAGTTGCA	GCCCTCGGTT	AGTCTCCCAG	TGGAAAAATC	GGTTGTGCCT	2460
CCCTGCTTCC	CACCATAGCT	GCCTGAAAAC	GTACGCTCT	CAAGCTTGTC	CTTCCTTCAG	2520
GAAGATGTCC	ACTCATGCCC	ACCCATGAGA	GGGCTTGCCG	TATGCCCTGG	CCTTTGGGCA	2580
TATTTATGTA	GAGTTCCTTT	CTCCTAAGAC	GTGAGTTTCT	CATGGGGGAT	GTACGAGTAA	2640
AAAGGTTAAC	TTCTGTTCTT	ATGCGTGGCG	CTGTGTTTAC	TTTCCAGAGT	CTCTGTTTCGT	2700
TTGTTTGGAT	GGCGGTCTCG	GGGTACGGCA	GCGTGTGTGC	GTACGTGTCT	GTGTGTGTGT	2760
GTGTGTGTGT	GTGTGTGTGT	GTGTGTGTGA	AATCGTGCAA	ATCTACAACA	TGTCCCAGCC	2820
CATTCTCCGT	TGAAACAGAT	CACAGCAACG	ACAAACGCTC	ATGGCGCTGC	TTTGCTCCAC	2880
CCGCTTCAGA	TAGATCATTG	TTAGATATTT	CACATTTTTG	TATGGTGGAA	ATAAAAATGA	2940
AAAATGTATT	TCCAAAAGAT	GAAAATTAAA	AACATTTTCA	TAGGAAAAAA	AAAAAAAAAA	3000
AA						2

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 13

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 12
- (B) ART: Aminosäuresequenz
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(v) ART DES FRAGMENTS: inneres Fragment

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 13

ADFFAIGFSG IS

12

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 14

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 15
- (B) ART: Aminosäuresequenz
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(v) ART DES FRAGMENTS: inneres Fragment



(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 13

LVIGHNMLLV MHTVH

15

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 14

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 16

(B) ART: Aminosäuresequenz

(C) STRANGFORM: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(v) ART DES FRAGMENTS: inneres Fragment

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 14

SEQLHEAGYA YITGLC

16

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 15

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 12

(B) ART: Aminosäuresequenz

(C) STRANGFORM: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(v) ART DES FRAGMENTS: inneres Fragment

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 15

CDFVAIFFLG LD

12

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 16

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 15

(B) ART: Aminosäuresequenz

(C) STRANGFORM: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(v) ART DES FRAGMENTS: inneres Fragment



8

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 16

LVVGHNSLLA MYMYH

15

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 17

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 16

(B) ART: Aminosäuresequenz

(C) STRANGFORM: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(v) ART DES FRAGMENTS: inneres Fragment

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 17

ENVYHNAGFS YVTGEV

16

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 18

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 12

(B) ART: Aminosäuresequenz

(C) STRANGFORM: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(v) ART DES FRAGMENTS: inneres Fragment

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 18

ADFVAILMTG VT

12

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 19

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 15

(B) ART: Aminosäuresequenz

(C) STRANGFORM: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(v) ART DES FRAGMENTS: inneres Fragment



(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 19

LIVGHNCFLI AHVYS

15

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 20

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 16

(B) ART: Aminosäuresequenz

(C) STRANGFORM: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(v) ART DES FRAGMENTS: inneres Fragment

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 20

AGGKHEAGYA FMTGCI

16

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 21

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 12

(B) ART: Aminosäuresequenz

(C) STRANGFORM: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(v) ART DES FRAGMENTS: inneres Fragment

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 20

GTLVAIAFVS LQ

12

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 22

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 15

(B) ART: Aminosäuresequenz

(C) STRANGFORM: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(v) ART DES FRAGMENTS: inneres Fragment

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 22

VFVGHGLNNF KHINI

15



10

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 23

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 - (A) LÄNGE: 16
 - (B) ART: Aminosäuresequenz
 - (C) STRANGFORM: Einzelstrang
 - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid
- (v) ART DES FRAGMENTS: inneres Fragment
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 23

QEGNHDSIEA HTALIL

16

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 24

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 - (A) LÄNGE: 12
 - (B) ART: Aminosäuresequenz
 - (C) STRANGFORM: Einzelstrang
 - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid
- (v) ART DES FRAGMENTS: inneres Fragment
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 24

FPAIALTFVR TR

12

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 25

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 - (A) LÄNGE: 15
 - (B) ART: Aminosäuresequenz
 - (C) STRANGFORM: Einzelstrang
 - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid
- (v) ART DES FRAGMENTS: inneres Fragment
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 25

TKFLHAGSEL EVFLN

15

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 26

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 - (A) LÄNGE: 15



11

- (B) ART: Aminosäuresequenz
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(v) ART DES FRAGMENTS: inneres Fragment

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 26

ERQEWAAAVW YLLPI

15

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 27

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 12
- (B) ART: Aminosäuresequenz
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(v) ART DES FRAGMENTS: inneres Fragment

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 27

APVFAFTTDS LD

12

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 28

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 15
- (B) ART: Aminosäuresequenz
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(v) ART DES FRAGMENTS: inneres Fragment

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 28

LKVGQNLKYR GILAN

15



1

2

3

4

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 29

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 15

(B) ART: Aminosäuresequenz

(C) STRANGFORM: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(v) ART DES FRAGMENTS: inneres Fragment

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 29

EEAGRAAEAD VTLQL

THIS PAGE BLANK (USPTO)